



Svampegeners funktion afsløres med genteknologi

Giese, Henriette; Ravnholt, Kristine Slot; Olsson, Stefan; Andersson, Jens Asbjørn;
Johansen, Thomas; Frandsen, Rasmus John Normand

Published in:
Planteforskning.dk

Publication date:
2008

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Giese, H., Ravnholt, K. S., Olsson, S., Andersson, J. A., Johansen, T., & Frandsen, R. J. N. (2008).
Svampegeners funktion afsløres med genteknologi. *Planteforskning.dk*.
http://www.planteforskning.dk/artikler/bioteknologi/svampegeners_funktion

Svampegeners funktion afsløres med genteknologi

Filamentøse svampe som *Fusarium* og *Aspergillus* kan danne et arsenal af biologisk aktive stoffer, hvoraf mange er giftige for både planter og dyr. Disse stoffer er uønskede i fødekæden, men de har et stort potentiale i den biomedicinske industri. Genetisk modificerede varianter af *Fusarium graminearum* er vigtige redskaber til undersøge de mekanismer, der styrer svampens produktion af komplekse stoffer.

Af Henriette Giese, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet, Kristine Ravnholdt, Stefan Olsson, Jens Andersson, Thomas Johansen og Rasmus Frandsen, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Den økonomiske betydning af filamentøse svampe er enorm. Udbyttetab som følge af svampesygdomme i afgrøder og sygdomme hos mennesker og dyr pga. af svampenes produktion af toksiske stoffer (mykotoxiner) medfører kolossale omkostninger for samfundet. Men filamentøse svampe er også effektive produktionsorganismer, og de bruges til fremstilling af mange typer af medicin og enzymer til industriel og privat brug.

Interessen for de filamentøse svampe har ført til sekventeringen af hele arvemassen (genomet) for ca. 30 forskellige svampearter. Deriblandt er *Fusarium graminearum*, som bl.a. angriber hvede, byg, rug, havre, ris og majs (Figur 1). Angreb af *Fusarium* kan medføre store udbytte- tab og, da kornprodukter udgør de primære kulhydratkilder for mange mennesker verden over, kan *Fusarium* og andre patogene svampe true fødevareforsyningen.

Et andet problem ved *Fusarium*-svampene er, at de danner nogle meget stabile mykotoxiner, deriblandt toksiner, som har østrogeneffekt eller som hæmmer proteinsyntesen hos pattedyr. Mykotoxinerne optages i fødekæden via inficerede kerner og kan medføre alvorlige sygdomme hos dyr og mennesker, men med kontrolleret anvendelse har nogle af stofferne også et medicinsk potentiale.

I denne artikel beskrives grundvidenskabelige studier af

samspillet mellem *Fusarium* og planter samt nogle af de metoder, som anvendes i forskningen. Resultaterne er med til at danne grundlaget for forskning med specifikke anvendelsesorienterede formål. Større viden om, hvordan svam-



Figur 1. *Fusarium graminearum* på aks af hvede. Uinficeret hvede (tv), hvede inficeret med vildtype *F. graminearum* (midt) og en mutant af *F. graminearum* (th). Sorten er 'Leguan'. Denne sort ser lidt anderledes ud end de hvedesorter, som normalt dyrkes. Foto: Matilde Bylov Kristensen.

Ordforklaring

Bioinformatik - Anvendelse af matematiske og datalogiske metoder til at analysere (molekylær-) biologiske, biokemiske og medicinske problemstillinger.

Filamentøse svampe - Svampe, som består af multicellulære filamenter, der betegnes hyfer.

Fluorescens - Udskiftning af fotoner, der resulterer i frigivelse af energi i form af lyssignal.

GFP-gen - Et almindeligt brugt reporter-gen, som koder for et fluorescerende protein (Green fluorescent protein; GFP). GFP-genet stammer fra en vandmand.

Homolog rekombination - Overkrydsning mellem to DNA-molekyler i områder, hvor de to DNA-molekyler har samme sekvens.

Hygromycin B - Et antibiotikum som dræber bakterier, svampe og højere eukaryote celler ved at hæmme proteinsyntesen.

Læseramme - Den del af en gensekvens, som oversættes til et peptid. Kaldes også 'Open reading frame' eller ORF. Tre baser danner et kodon, som oversættes til en aminosyre.

Mutant - En variant af vildtypen, som har en ændring i genomet, som kan resultere i en specifik fænotype. En mutant, hvor et gen er fjernet eller inaktiveret, så genproduktet mangler, kaldes en knock out mutant.

Mutation - En insertion, en deletion eller udskiftning af basepar kan ændre DNA-sekvensen for et gen. Hvis læserammen ændres (en frameshiftmutation) får proteinet en helt anderledes aminosyresekvens.

Mykotoksin - En meget blandet gruppe af mere eller mindre giftige organiske forbindelser, som produceres af forskellige svampe.

NMR - Nuclear Magnetic Resonance eller Kernemagnetisk resonans er en spektroskopisk metode, der bygger på atomkerners spin. NMR kan bruges til at undersøge molekylers struktur og deres rumlige og elektroniske opbygning.

Non-ribosomale peptider - Små peptider som er syntetiseret af store multifunktionelle enzymer kaldet peptidsyntetaser.

Patogen - Sygdomsfremkaldende organisme.

Polyketid - Et kulhydrat, som indeholder mange keto-grupper, dvs. kulstofatomer med en dobbeltbinding til et oxygenatom.

Reporter-gen - Et gen, hvis udtryk er let at følge, enten visuelt eller ved en simpel test.

Resistens - Modstandskraft overfor sygdomme eller skadedyr.

T-DNA - Den del af Ti-plasmidet, som overføres til en anden organismes genom ved *Agrobacterium*-transformation.

Ti-plasmid (Tumor Inducing plasmid) - Cirkulært DNA molekyle med T-DNA. Forekommer i bakterierne *Agrobacterium tumefaciens* og *A. rhizogenes* som kan overføre T-DNA fra Ti-plasmidet til planters genom.

pene inficerer deres værtsplante, hvilken rolle toksinerne spiller for sygdomsudvikling i planter, og hvordan planter reagerer på angreb kan bidrage til udvikling af metoder til reduktion af svampeangreb på afgrødeplanter, mens opklaring af syntesevejene for mykotoksiner og andre biologisk aktive stoffer kan gøre det muligt at udnytte nogle af disse stoffer i den biomedicinske industri.

Mange forskellige genprodukter er nødvendige for at en svamp kan genkende en mulig værtsplante, omgå plantens forsvarssystem, optage næring og vokse i plantens væv. Mykotoksinerne har en betydning, men der vil være mange andre genprodukter, som også påvirker *Fusariums* infektionsevne. Analyse af DNA-sekvenserne har bidraget til

identifikation af mange vigtige gener i *F. graminearum*, men bioinformatiske analyser er ikke tilstrækkelige til at afdække de mange forskellige genprodukters funktion.

Stammer af svampen, som mangler eller overudtrykker bestemte gener pga. ændringer i arvemassen (mutationer), er vigtige redskaber til bestemme specifikke geners funktion. Ved hjælp af mutanter er det f.eks. muligt at afgøre om et gen, som er ændret i mutanten, medvirker til syntesen af mykotoksiner eller andre komplekse molekyler.

Fremstilling af mutanter

Mutationer forekommer naturligt i alle organismer, men man skal være meget heldig for at finde en stamme af en svamp, hvor der er opstået en mutation i netop det gen, som man ønsker at undersøge. Man kan i stedet fremstille mutanter ved at udsætte svampen for en behandling, som ændrer dens DNA. F.eks. kan gener ødelægges med bestråling eller med mutagene kemiske stoffer.

Der kan også opstå mutanter ved transformation, hvis der indsættes et stykke DNA i et gen, så genets læseramme eller genproduktets funktion ødelægges. Bakterien *Agrobacterium tumefaciens* er velegnet til at fremstille forskellige varianter af *F. graminearum* (Boks 1). En mutant, som har fået ødelagt et gen, kaldes også en knock out mutant.

Det er hurtigt og nemt at inducere mutationer i svampe, men de mutationer, som opstår ved hjælp af bestråling, kemisk behandling og de hyppigst anvendte transformationsmetoder, rammer tilfældige steder i genomet. Det er derfor nødvendigt at udføre et omfattende screeningsarbejde for at finde en mutant, som har en mutation netop i det gen, som man ønsker at undersøge, og screening og karakterisering af mutanterne udgør en flaskehals for forskningen. Der er derfor behov for hurtige, effektive og målrettede metoder til at generere mutanter, hvor specifikke gener er inaktive eller overudtrykkes.

Udskiftning af gener

I modsætning til planter og dyr har svampe den fordel, at man kan erstatte ét gen med et andet. Man kan udskifte et specifikt stykke DNA i svampens genom ved homolog rekombination (overkrydsning). Typisk udskiftes et af svampens gener med et gen, som giver resistens overfor et antibiotikum, f.eks. hygromycin B. Resultatet er en knock out mutant med hygromycinresistens.

Til fremstilling af sådan en mutant bruges *Agrobacterium* til transformation og et plasmid, hvor T-DNA'et indeholder et hygromycinresistensgen, som skal erstatte det oprindelige gen i svampens genom (Figur 2). Plasmidet konstrueres, så hygromycinresistensgenet, omgives af kopier af to specifikke DNA-sekvenser fra svampen. Efter transformationsproceduren dyrkes svampesporerne på agarplader, som indeholder hygromycin B. Kun svampesporer, som har fået indsat hygromycinresistensgenet, kan vokse på pladerne.

Der er fremstillet mange mutante stammer af *F.*

Boks 1. Transgene svampe

Nogle bakteriearter af slægten *Agrobacterium* er meget effektive til at overføre gener fra cirkulære DNA-stykker (plasmider) til planters genom, og indsættelse af et stykke af bakteriens DNA i et af værtsplantens kromosomer er en del af bakterierens naturlige livscyklus. De arter af *Agrobacterium*, som lever i naturen, indsætter gener, som får planten til at danne tumorer og særlige metabolitter, som normalt ikke dannes i planter. Tumoren fungerer både som bolig og som spisekammer for bakterierne (Figur A).



Figur A. *Agrobacterium tumefaciens* på bøg (*Fagus sylvatica*). Eskemose skov i Nordsjælland. Foto: Jens A. Andersson.

*Agrobacterium*s evne til at transformere planteceller har været udnyttet til udviklingen af kommercielt dyrkede sorter af bl.a. majs og soja med insektresistens og/eller tolerance overfor ukrudtsmidler, men der fremstilles langt flere transgene planter, som udelukkende anvendes til forskningsformål.

I naturen begrænser *Agrobacterium*-stammernes værtsspektrere sig til bestemte tokimbladede plantearter, men under laboratorieforhold kan bakterierne også bringes til at overføre gener til svampe og endda til dyreceller.

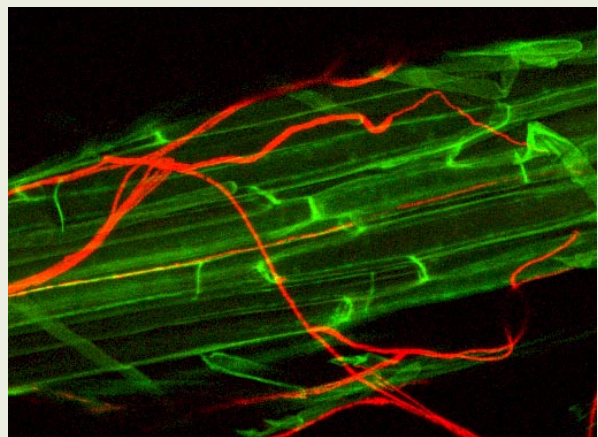
*Agrobacterium*s evne til at overflytte gener til eukaryote organismers kromosomer udnyttes i svampeforskningen til at fremstille genetisk modificerede varianter af svampene. Ofte indsættes et ekstra gen, men man kan også udskifte et af svampens gener med et andet.

For at få gener ind i svampens genom dyrkes *Agrobacterium* sammen med svampesporer under forhold, der snyder bakterien til at tro, at den er i nærheden af en såret plantecelle (Figur B). Bakterien aktiverer derved sit DNA-overførselsmaskineri, og de gener, som er placeret i en bestemt region (T-DNA) i et modificeret Ti-plasmid i bakterien, overføres til svampens genom.

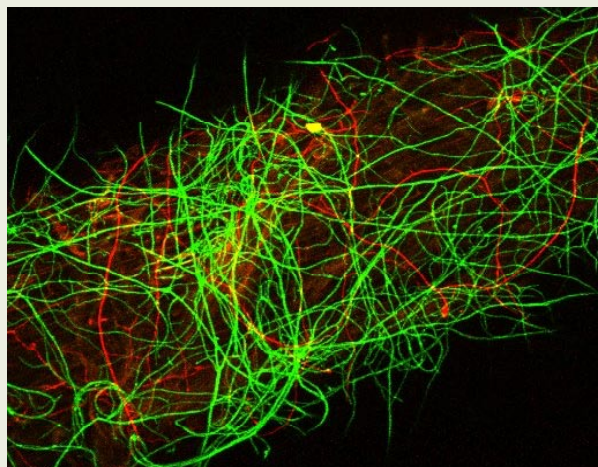
Til brug for studier af infektionsproceessen er der fremstillet stammer af *Fusarium*, som har fået indsat reportergener i genomet. Reportergenerne producerer fluorescerende stoffer, f.eks. GFP eller DsRed, som lyser hhv. grønt og rødt ved belysning med bestemte bølglængder. Ved traditionel mikroskopi af svampeinficeret plantevæv farves prøven for at kunne skelne svampens mycelium og sporer fra strukturer i planten, men farvningen slår både svamp og plantevæv ihjel, og man får derfor kun et øjebliksbillede af infektionen. Med konfokal mikroskopi af kan man observere, hvordan transgene stammer af svampen vokser i levende plantevæv (Figur C og D).



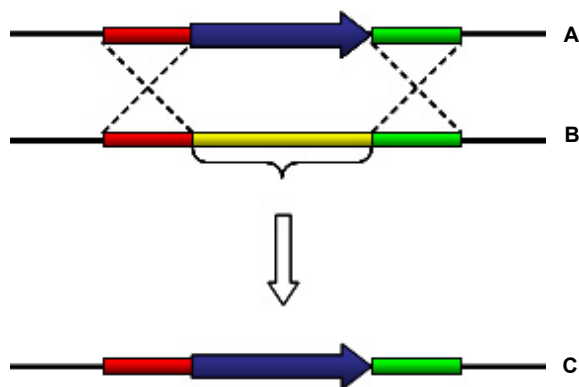
Figur B. Sporer af *Fusarium graminearum*. Til venstre ses en spirende spore, som er koloniseret af *Agrobacterium tumefaciens*. Til højre ses en inaktiv spore. De små prikker er *A. tumefaciens*. Foto: Jens A. Andersson.



Figur C. Transgen *F. avenaceum* med DsRed koloniserer en bygrod. Foto: Thomas Johansen.



Figur D. Bygrod der er koloniseret af *F. culmorum* med GFP og *F. avenaceum* med DsRed. Svampens hyfer vokser imellem rodcellerne, men kan også trænge direkte ind i cellen. Begge svampe vokser inde i roden, og der ser ikke ud til at være antagonistiske reaktioner imellem dem. Foto: Thomas Johansen.



Figur 2. Udskiftning af et gen i *F. graminearum*. Udsnit af et plasmid (A), svampens DNA (B) og rekombineret DNA i svampen (C). Plasmidet indeholder et gen for hygromycinresistens (blå pil), flankeret af to stykker DNA fra svampen (markeret med rødt og grønt). Disse DNA-stykker skal svare til de sekvenser, der omgiver det gen, som skal skiftes ud (markeret med gult). Placeringen af sekvenserne på hver side af resistensgenet giver mulighed for, at der kan ske homolog rekombination mellem T-DNA'et og svampens genom.



Figur 3. Et sterilt system bliver brugt til at studere, hvordan *F. graminearum* inficerer rydder af byg. Infektion (rodfusariose) kan ses ved tilstedeværelsen af rødt pigment på rydderne. Planterne inokuleres med vildtype svamp og genetisk modificerede varianter af den samme svamp, hvor et af vildtypen gener er erstattet af et fungicidresistensgen. På den måde undersøger man om det gen, man har fjernet, er nødvendigt for, at svampen kan angribe planten.

graminearum, hvor gener med potentiel betydning for infektionsprocessen er skiftet ud. Disse stammer testes for deres evne til at inficere rydderne på små bygplanter (Figur 3) og for deres evne til at inficere aks. Dermed kan man afgøre, om det gen, som er fjernet fra mutanten, har betydning for svampens evne til at inficere planten.

Mykotoxiner

Nogle svampemetabolitter kategoriseres som mykotoxiner på grund af giftighed overfor andre levende organismer, men organiske forbindelser kan være giftige på mange forskellige måder. Mykotoxiner er kemisk set en meget broget størrelse, og mange forskellige typer af stoffer kategoriseres som mykotoxiner (Boks 2). Mange af de mykotoxiner, som dannes af *Fusarium* er relativt velkarakteriserede med hensyn til kemisk struktur og deres effekt på pattedyr, men syntesevejene har hidtil været stort set ukendte.

De omtalte arter af *Fusarium* angriber primært aks af kornsorterne og producerer mykotoxiner under kernefyldningen, men mykotoxinernes betydning for infektionsprocessen er langt fra klarlagt. Nogle mykotoxiner er nødvendige, for at svampen kan vokse i plantevævet, men det er ikke alle mykotoxiner, som har betydning for etablering af svampen og det videre forløb. Toksinernes rolle afhænger også af plantearten. For eksempel er trichothecener afgørende for, om *Fusarium* kan inficere hvede. Disse toksiner undertrykker hvedeplantens forsvarsreaktion, men det gælder ikke for byg. Mutanter af *Fusarium*, som ikke danner zearalenon, har samme angrebsevne som vildtypen, så det er stadig lidt af et mysterium, hvorfor *Fusarium* laver toksiner i planter.

Biosyntese af mykotoxiner

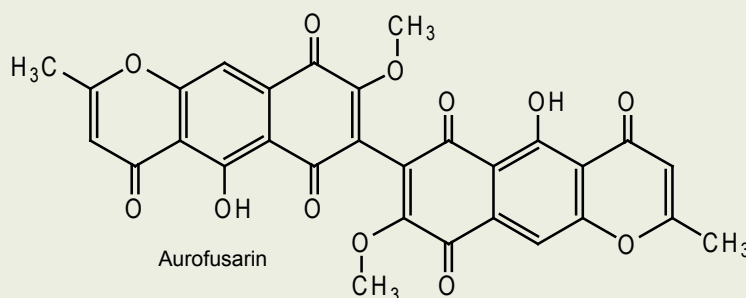
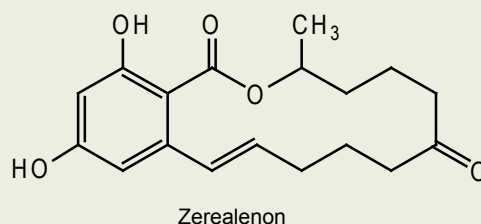
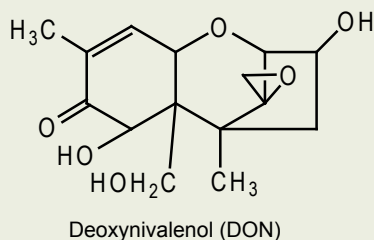
Fælles for mykotoxinerne er, at de har meget komplicerede kemiske strukturer. Faktisk er de så komplekse, at de ikke kan fremstilles i større mængder ad syntetisk vej.

Zearalenon og aurofusarin tilhører en gruppe af stoffer, som kaldes polyketider. Polyketider dannes af en gruppe enzymer der kaldes for polyketidsyntaser (PKS'er). Disse enzymer kan danne lange kulstofkæder ved at fusionere kortere kulstofkæder, der typisk er 2-3 kulstofatomer lange. Polyketidsyntaser indeholder en række funktionelle dele (aktive sites), der hver især kan udføre én specifik funktion. Én del af enzymet indfanger f.eks. de korrekte kulstofkæder, mens andre dele fusionerer kulstofkæderne til længere kæder, modificerer kulstofkæderne eller frigiver det færdige stof fra enzymet. De funktionelle dele arbejder sammen og virker som et samlebånd, hvor stoffet, der skal produceres, bevæger sig fra en specialiseret maskine til den næste. Længden af den færdige kulstofkæde og graden af modifikationer bestemmes af den pågældende PKS, så informationerne er på en eller anden måde indkodet i enzymet. Ingen ved på nuværende tidspunkt hvordan. De færdige polyketider kan efter endt produktion

Boks 2. Mykotoksiner

De forskellige mykotoksiner er udviklet over millioner og atter millioner af år til at løse forskellige problemer for de skimmelsvampe, der producerer dem. Nogle mykotoksiner beskytter svampen mod insekter og larver, der ellers ville spise dem; andre beskytter svampes celler mod skadelige UV-stråler fra solen. Andre igen udskiller stofferne til deres omgivelser for at forgifte andre svampe og bakterier, så de kan få eksklusiv adgang til den næring, der findes i omgivelserne. En række af stofferne spiller også en stor rolle for svampens evne til at inficere værtsplanter, da de forgifter plantecellerne eller snyder dem til at producere stoffer som svampen kan bruge.

Fusarium danner mange forskellige mykotoksiner, som har forskellig effekt på mennesker og dyr. Trichothecener, som f.eks. deoxynivalenol (DON), hæmmer proteinsyntesen hos pattedyr. Zerealenoner ligner østrogen og bindes til østrogenreceptorer hos pattedyr. Stoffet giver store problemer i svineindustrien. Aurofusarin har ingen eller begrænset effekt på pattedyr, men stoffet er giftigt for fugle. Hvis koncentrationen i foderet til fjerkræ er høj, forringes kvalitet af både æg og kød.



blive yderligere modificeret af andre enzymer i svampen. Der kan derfor dannes mange forskellige polyketider med samme grundstruktur.

Identifikation af generne

Biosyntesen af det flotte røde pigment, aurofusarin, der gør mange af *Fusarium* arterne røde, er et ideelt system til at studere syntesen af polyketider, da mutanter af svampen mister det røde pigment og kan skelnes fra vildtypen med det blotte øje. *Agrobacterium* blev udnyttet til at overføre T-DNA til svampens genom på tilfældige steder, og vi udvalgte så mutanter, der havde mistet deres røde farve. T-DNAet ødelægger de gener, hvor det sætter sig ind, og på den måde kan man identificere gener, der påvirker en bestemt egenskab, i dette tilfælde evnen til at producere aurofusarin.

I svampe findes generne for de enzymer, der deltager i en enkelt biosyntesevej, placeret samlet i svampens genom, som perler på en snor. I andre organismer, såsom planter og dyr, ligger generne derimod spredt ud over hele genomet. Det giver svampforskerne en stor fordel, da identifikationen af et enkelt gen, der er involveret i en biosyntesevej, automatisk afslører de øvrige gener. Svampe er således perfekte forsøgsorganismer til at få forståelse for syntesen af komplekse molekyler som polyketider samt de

forhold, der påvirker, hvor og hvornår de bliver lavet.

De PSK-gener, der er ansvarlige for syntesen af aurofusarin, er som forventet placeret i en genklynge. Vi fandt en genklynge med 10 gener, der er ansvarlige for syntesen af aurofusarin. Derefter kunne vi begynde at udskifte hvert af de ti gener ved *Agrobacterium*-medieret transformation og homolog rekombination. Herved var det muligt at bestemme, hvilke kemiske reaktioner de enkelte enzymer foretager, og i hvilken rækkefølge de virker. To af mutanterne mistede helt deres farve og var mælkehvide, fem mutanter fik en flot gul farve, en mutant blev gulgrøn og en blev mørkegrøn (**Figur 4**).

Med bioinformatik er det muligt at forudsige, hvilken funktion nogle af de identificerede gener kunne have, men for at forstå hvilke reaktioner de enkelte enzymer foretager i syntesevejen, blev de producerede farvestoffer oprenset og undersøgt via kernemagnetisk resonans (nuclear magnetism resonance eller NMR), som gør det muligt at bestemme stoffernes kemiske struktur. NMR-undersøgelserne viste, at alle de isolerede farvestoffer delte samme grundstruktur og derfor måtte udgøre mellemprodukter i syntesevejen til aurofusarin. Når polyketid-syntasegenet var fjernet blev svampen hvid. Det beviser, at denne PKS er ansvarlig for at danne grundstrukturen af aurofusarin-molekylet. De øvrige

mutanter med forskellige farver havde mistet deres evne til at modificere grundstrukturen og ophobede forskellige mellemprodukter.

Analysen af aurofusarin syntesen har vist hvordan vi kan opklare syntese veje og forstå hvordan slut produktet, mykotoksinet bliver dannet. Vi har også bidraget til identifikationen af den PKS der er ansvarlig for syntesen af zerealenon, og vi vil fortsætte med at analysere de yderligere 14 PKS-synteseveje, der er identificeret i *F. graminearum*.

Non-ribosomale peptider

En særlig gruppe stoffer, hvoraf nogle er mykotoksiner, kaldes non-ribosomale peptider. De produceres af gigantiske enzymer, non-ribosomale peptidsyntaser (NPS'er), der helt unikt kan samle aminosyrer til små peptider uden et mRNA og uden ribosomernes medvirken.

De multienzymer som danner non-ribosomale peptider har mange katalytiske domæner, nogle op mod hundrede mod normalt kun nogle ganske få i gængse typer af enzymer. Domænerne er ordnet i moduler, og hvert modul kan som minimum binde én aminosyre og lave én peptid-binding med nabodomænets aminosyre. De anvendte aminosyrer er ikke begrænset til de tyve standardamino-syrer som ribosomerne benytter. Tilmed er carboxylsyrer også set brugt. Det medfører, at produkterne, de nonribosomale peptider, har meget forskellige udseender og funktioner. Blandt produkterne findes antibiotika som penicillin, bleomycin og epothilone, der anvendes som kræftmedicin, pigmenter og immuno-suppressive agenter som cyclosporin A. Hos patogene svampe har nogle non-ribosomale peptider vist sig at være infektionsfaktorer.

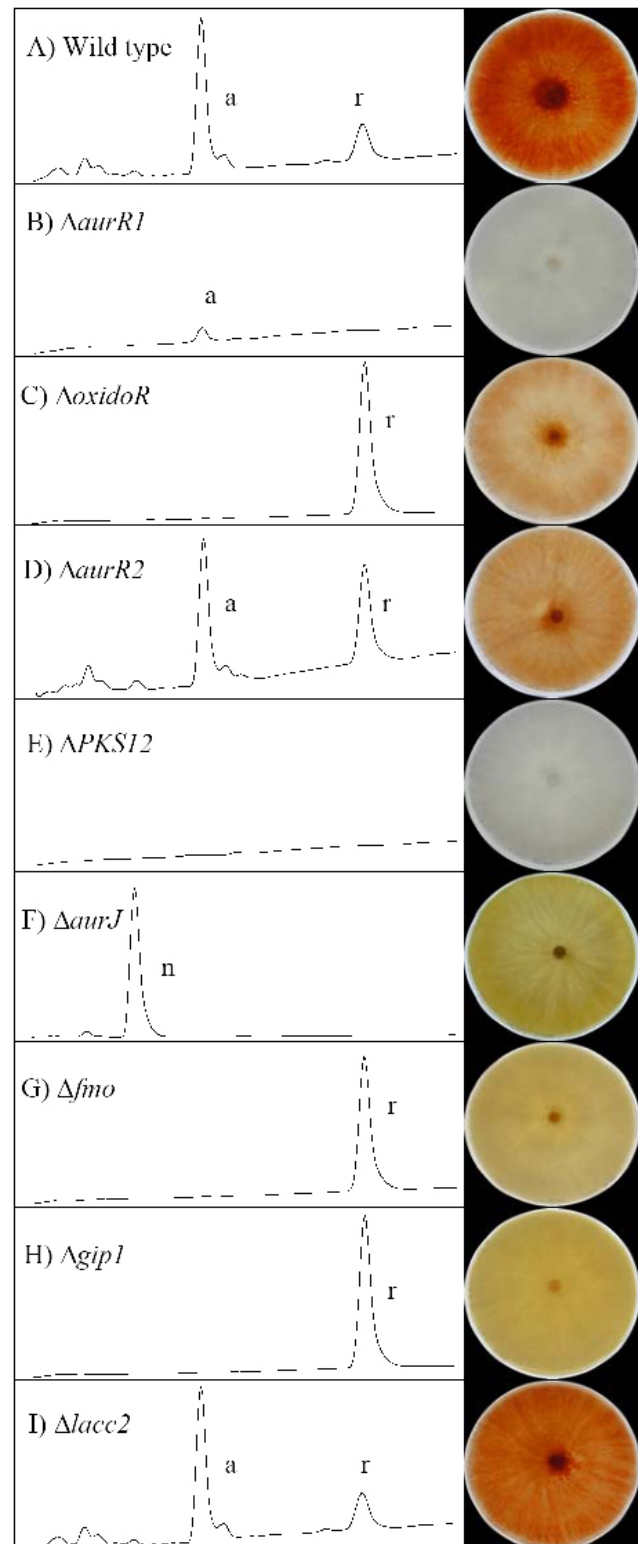
NPS-gener er meget lange og har en karakteristisk opbygning. Det gør det muligt at udpege mulige NPS-gener ud fra DNA-sekvensen. Ved bioinformatik har vi identificeret 19 forskellige NPS-gener i *Fusarium graminearum*. Da vi arbejder med at forstå *Fusarium graminearum*'s interaktion med værtsplanten undersøgte vi, hvornår de 19 gener var funktionelle. Vi fandt, at flere af generne primært blev brugt under svampens infektion af bygrødder.

Sideroforer

Tre af de 19 NPS-gener koder for sideroforer, en særlig gruppe molekyler, som binder jern. På græsk betyder siderofor jernbærer, og det er præcis det de gør i udvalgte bakterier, svampe og planter. Et af de tre siderofor-producerende NPS-gener var aktive under *Fusariums* infektion af bygrødder.

For at forstå sideroforers funktion og betydning må man begynde med jern. Jern er essentiel for alle levende organismer, fordi det er en nødvendig faktor for mange livsvigtige enzymeres aktivitet. Paradoksalt er jern også toksisk, da det sammen med ilt danner frie radikaler, der bl.a. ødelægger DNA og cellemembraner. Det er derfor vigtigt med en fin balance mellem optagelse og forbrug af jern. For at gøre

tingene endnu mere komplicerede er jern ikke særlig tilgængeligt i jord og andre vandige omgivelser. Der udspiller



Figur 4. Funktionen af de enkelte gener i én syntesevej kan bestemmes ved at erstatte generne et ad gangen og udføre en kemisk analyse, der viser hvilket stof der bliver dannet. Figuren viser de forskellige mellemprodukter i syntesen af det røde pigment aurofusarin.

sig derfor en nådesløs kamp om jern på liv og død arterne i mellem. Et våben i denne kamp er sideroforer, som sendes ud i omgivelserne. Disse sideroforer bliver kun lavet, når cellen mangler jern. De er meget stabile, og de er så gode til at binde jern, at de kan hive jern-atomer ud af glas, hvor jernet normalt er stærkt bundet. Når cellen senere støder på sideroforer-bærende jern, optages de igen via specielle transportører i cellemembranen. Nogle organismer er så konkurrencedygtige, at de har udviklet optagelsessystemer til andre organismers sideroforer.

Da jern er toksisk, kan cellen ikke have det til at flyde frit, og løsningen i mange filamentøse svampe er en siderofor, der aldrig forlader cellen. Den holder på jern, indtil det skal bruges inde i cellen. Produktionen af denne intracellulære siderofor er ikke så afhængig af jernniveauet, så cellen har altid et lager af tomme sideroforer i tilfælde af høje jernkoncentrationer.

De tre siderofor-producerende NPS'er, som vi fandt ved bioinformatik blev analyseret ved brug molekylær-genetiske metoder og kemiske analyser. Vi erstattede NPS-generne med gener for antibiotikaresistens. Således lavede vi tre nye stammer af svampen, der hver mangler et af de tre NPS-gener. Disse stammer blev dyrket under forhold, hvor generne normalt er højt udtrykt, og der blev udført kemiske analyser. Det er muligt ved HPLC (High Performance Liquid Chromatography) at identificere sideroforer kemisk. Ved at sammenligne produkterne fra vildtypen af svampen med vores nye mutanter, fandt vi frem til hvilken siderofor, den enkelte NPS producerer. Ved samtidigt at undersøge hvilke sideroforer, der er i dyrkningsvæsken og inde i svampens celler, fandt vi at to af sideroforerne bliver udskilt til omgivelserne. Den ene af disse bliver produceret af den NPS, som primært udtrykkes under infektion af bygrødder.

Nye studier vil fokusere på infektionsbiologi for at undersøge sideroforenes betydning for svampens evne til at angribe byg og hvede.

Potentialet

Den forskning, som beskrives i denne artikel indgår i flere forskellige forskningsprojekter, dels med specifikke anvendelsesorienterede formål, dels med det formål at udføre grundvidenskabelige studier af samspillet mellem *Fusarium* og planter. (**Boks 3**).

Analysen af aurofusarinsyntesen har vist, hvordan vi kan opklare synteseveje og forstå, hvordan slutproduktet, mykotoksinet, bliver dannet. Vi har også bidraget til identifikationen af den PKS, der er ansvarlig for syntesen af zerealenon, og vi fortsætter med at analysere de yderligere 14 PKS-synteseveje, der er identificeret i *F. graminearum*.

I fremtiden vil man gerne kunne fremstille nye bioaktive polyketider ved at ændre på de funktionelle dele af naturlige polyketidsyntasegener. Det ultimative mål er at kunne forudsige, hvilken betydning de enkelte ændringer vil have for det producerede stof. Hvis det lykkes, vil det åbne for muligheden for at designe og fremstille organiske stoffer

med specifikke egenskaber og anvendelsesmuligheder.

Grundlæggende viden om optagelse og transport af jern i eukaryoter kan vise sig at få betydning for millioner af menneskers ernæring i især fattige lande, hvor kosten primært består af kornprodukter med meget lavt indhold af jern, og hvor plantesygdomme ofte reducerer fødevareforsyningen. Studier af sideroforer kan muligvis bidrage til udvikling af planter med et højere indhold af jern og større modstandskraft mod svampesygdomme. Enkimbladede planter laver deres egne sideroforer, som binder jern og formidler optag igennem roden. Desuden er der et internt jernbindende stof, der transporterer jern til akset. Det minder meget om svampenes strategi, og det kan tænkes, at der er konkurrence om jern, når svampen inficerer planten. Det ville være spændende at undersøge om svampens sideroforer hugger jern fra planternes sideroforer. Det kan undersøges ved jernbindingsforsøg rent kemisk, men også planteforsøg og ekspressionsanalyser vil kunne give viden om kampen om jern under infektion. Hvis planten er i stand til at sulte svampen for jern, vil det resultere i hæmning af svampevækst, som det ses i nogle svampestammer, der ikke kan producere sideroforer. Det kunne muligvis være en metode til at begrænse *Fusarium*-infektioner.

Referencer og videre læsning

- Frandsen RJN, Nielsen NJ, Maolanon N, Sørensen JC, Olsson S, Nielsen J, H Giese (2006) The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. *Molecular Microbiology* 61(4) 1069-1080.
- Jørgensen LN, Thrane U, Collinge DB, Jørgensen HJL, Jensen JD, Spliid NH, Nielsen GC, Rasmussen PH, Nicolaisen M, Justesen AF, Giese H, Bach IC (2008). *Fusarium* på korn skader planter, husdyr og mennesker. Planteforskning.dk.
- Tobiasen C, Aahman J, Ravnholt KS, Bjerrum MJ, Grell MN, Giese H (2007). Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as the producer of ferricrocin. *Current Genetics* 51:43-58.

Boks 3. Danske forskningsprojekter med fokus genetik og biosyntese i *Fusarium*

DNA-chip for monitoring fungi in cereals

Sammenhængen mellem transkription af gener involveret i toksinsyntese og produktionen af stoffet undersøges under forskellige vækstbetingelser for svampen for at opnå en forståelse af, hvad der sætter toksin produktion igang. Desuden er der udviklet meget effektive transformationsteknologier, der gør det muligt at manipulere med svampen, så der kan laves rapportørstammer med GFP og mutanter, der ikke er i stand til at lave toksiner. Denne del af projektet udføres ved Det Biovidenskabelige Fakultet, KU.

Ved Aarhus universitet, Institut for Plantebeskyttelse og Skadedyr udvikles hurtigmetoder til at kvantificere indholdet af de enkelte *Fusarium*-arter i korn. Med de nye metoder måles toksinniveauet indirekte, idet man måler indholdet af DNA eller RNA fra specifikke toksinproducerende *Fusarium*-arter. Målemetoderne bygger enten på kvantitativ PCR eller på hybridisering til DNA chips. Hver *Fusarium*-art danner bestemte mykotoksiner, og det ser ud til at mængden af DNA eller RNA fra de enkelte *Fusarium*-arter i kornet giver et godt billede af koncentrationen af de forskellige toksiner i kornet. Projektet støttes af Direktoratet for FødevareErhverv (DFFE). Det blev påbegyndt i 2003 og er ved at være afsluttet. Kontaktpersoner: Mogens Nicolaisen og Henriette Giese, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet.

Selv-kannibalisme som en virulens faktor hos plantepatogene svampe

I dette projekt, som støttes af Willum Kann Rasmussen Fonden, undersøges autofagi-processen i samspillet mellem *Fusarium* og byg. Autofagi er en essentiel proces hos eukaryote organismer, hvorved defekte organeller og proteiner bliver fjernet og næringsstofferne genbrugt. Hos patogene svampe udgør autofagi en ideel proces til at omfordele næringsstoffer under infektionsprocessen, inden de kan få fat i plantens næringsstoffer, og i planten til at fjerne cellulære nedbrydningsprodukter fra døende celler. Derfor kan autofagi spille en central rolle for svampens evne til infektion og plantens evne til at begrænse skaderne. Vi har fremstillet en *Fusarium*-mutant, der mangler autofagi-processen og vist, at den giver mindre infektion i forhold til den normale type. Projektet blev påbegyndt i 2007 og afsluttes i 2010. Kontaktperson: Henriette Giese, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet.

Opdagelse af nye bioaktive stoffer i *Fusarium*

Transformationsteknologi bliver brugt til at fremstille mutanter, der overudtrykker eller slukker for ekspressionen af gener der forudsiges at være involveret i toksinproduktion. Ved kemisk analyse af disse mutanter og den oprindelige *Fusarium*-stamme er det muligt at identificere og karakterisere stofferne. Et stof er på denne måde ved at blive karakteriseret og det vil blive undersøgt om det har toksiske effekter eller kan udnyttes biomedicinsk. Projektet finansieres af Forskningsrådet for Teknologi og Produktion og gennemføres i perioden 2007-2010. Kontaktpersoner: Henriette Giese, Det Jordbrugsvidenskabelige Fakultet, Aarhus Universitet, og John Nielsen, Institut for Grundvidenskab og Miljø, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.

Fusarium disease resistance-toxins and feed quality

Vi er med i programmet "Fusarium disease resistance-toxins and feed quality", hvor David Collinge er koordinator. I det projekt ser vi på hvordan kernefyldning og protein kvalitet i forskellige bygsorter påvirker syntesen af sekundære metabolitter. Vi laver deletionsmutanter i gener der regulerer N metabolismen og proteom-analyse sammen med forskere fra Danmarks Tekniske Universitet (kontaktperson Birte Svensson) for at se ændringer i proteiner under infektionsprocessen. Projektet finansieres af Fødevareministeriet, Plant Biotech Denmark og Det biovidenskabelige Fakultet og gennemføres i perioden 2007-2010. Kontaktperson: David Collinge, Institut for Plantebiologi og Bioteknologi, Det Biovidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet.